

# 龙胆苦苷对非酒精性脂肪肝 TLR-4/NF- $\kappa$ B 和 AMPK/Nrf2 通路的影响

许琼梅<sup>1</sup>, 高雅<sup>1</sup>, 李梓萌<sup>1</sup>, 韦日明<sup>1</sup>, 马晓辉<sup>2</sup>, 晋玲<sup>2\*</sup>, 张可锋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 桂林医学院药学院, 桂林 541004; <sup>2</sup> 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000

**摘要:** 探讨龙胆苦苷(GPS)对非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠的保护作用及 TLR-4/NF- $\kappa$ B 和 AMPK/Nrf2 通路的影响。将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、二甲双胍组(200 mg/kg)和 GPS 高、中、低剂量组(120、60、30 mg/kg)。正常组给予标准饲料,其余各组给予高脂饲料饲养 14 周,建立大鼠 NAFLD 模型。生化法检测肝功能、氧化应激和脂质积累情况,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测胰岛素抵抗和炎症因子水平,蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测大鼠肝组织中 TLR-4/NF- $\kappa$ B 和 AMPK/Nrf2 通路蛋白表达情况;油红 O 染色观察肝脏组织病理学变化。结果表明,GPS 可降低 NAFLD 大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(FINS)的活性或含量,增强血清中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和高密度脂蛋白(HDL-C)含量,改善胰岛素抵抗情况,降低肝脏中白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ Bp-p65 和 TLR-4 的表达水平,提高 p-AMPK 与 Nrf2 蛋白表达水平。由此可见,GPS 改善 NAFLD 的作用机制可能与抑制氧化应激、炎症反应和调控 TLR-4/NF- $\kappa$ B、AMPK/Nrf2 信号通路有关。

**关键词:** 龙胆苦苷;非酒精性脂肪肝;氧化应激;炎症反应;TLR-4/NF- $\kappa$ B 通路;AMPK/Nrf2 通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)10-1652-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.10.004

## The effect of gentiopicroside on TLR-4/NF- $\kappa$ B and AMPK/Nrf2 in non-alcoholic fatty liver disease

XU Qiong-mei<sup>1</sup>, GAO Ya<sup>1</sup>, LI Zi-meng<sup>1</sup>, WEI Ri-ming<sup>1</sup>, MA Xiao-hui<sup>2</sup>, JIN Ling<sup>2\*</sup>, ZHANG Ke-feng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

<sup>2</sup> College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** To explore the protective effect of gentiopicroside (GPS) on non-alcoholic fatty liver (NAFLD) rats and the effects of TLR-4/NF- $\kappa$ B and AMPK/Nrf2 pathways. Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, metformin group (200 mg/kg) and GPS high, medium and low dose groups (120, 60, 30 mg/kg). The normal group was fed standard diet and the other groups were fed high-fat diet for 14 weeks to establish NAFLD model. Biochemical methods were used to detect the levels of liver function, oxidative stress and lipid accumulation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect insulin resistance and inflammatory factor levels. Western blot was used to detect the expression of TLR-4/NF- $\kappa$ B and AMPK/Nrf2 pathway proteins. Oil red O staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The results shows GPS reduces the activity or content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), cholesterol (TC), triglyceride (TG), total low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) and insulin resistance index (HOMA-IR), enhances the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), reduces the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), NF- $\kappa$ Bp-p65 and TLR-4 in the liver, in-

收稿日期:2020-06-09 接受日期:2020-09-17

基金项目:国家自然科学基金(81860673);广西八桂学者专项(2017143)

\* 通信作者 Tel:86-013659428030;E-mail:zyxyjl@163.com,xueshengcailiao@163.com

crease the expression levels of p-AMPK and Nrf2. In conclusion, the mechanism of GPS to improve NAFLD may be related to inhibition of oxidative stress, inflammatory and regulation of TLR4/NF- $\kappa$ B and AMPK/Nrf2 signaling pathways.

**Key words:** gentiopicroside; non-alcoholic fatty liver; oxidative stress; inflammatory response; TLR4/NF- $\kappa$ B pathway; AMPK/Nrf2 pathway

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指排除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征临床病理综合征, 与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和氧化应激关系密切<sup>[1,2]</sup>。随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变, NAFLD 在我国的发病率呈上升趋势, 遗传、糖尿病、高脂饮食、运动缺乏等内外因素都能诱发 NAFLD<sup>[3]</sup>。现代医学认为, NAFLD 由于氧化应激及胰岛素抵抗二次或多重打击引起的, 这一理念被国内外学者广泛认同<sup>[4]</sup>。因此抗炎抗氧化等经典策略可作为本病的基本治则。TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路是经典的炎症通路, 该通路是对各种刺激引起肝脏变化最常见的通路<sup>[5]</sup>。TLR4 的激发通过一系列信号转导激活 NF- $\kappa$ B, 继而促进炎症因子释放, 最终诱导肝细胞坏死并激活炎症级联反应。抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化是减轻肝组织炎症反应的关键通路, 也是下调与氧化应激有关的炎性表达的标志。同时, AMPK/Nrf2 信号通路在体内抵抗氧化应激和改善脂质沉积过程中发挥重要作用。Nrf2 是细胞防御系统抵抗氧化应激的主要调节因子, 有证据表明 Nrf2 的遗传缺失与更严重的 NAFLD 相关<sup>[6]</sup>。AMPK 是细胞能量稳态和炎症的中心调节剂, 能够调节脂肪酸生物合成, 并抑制氧化应激和炎症反应<sup>[7]</sup>。由于 Nrf2 和 AMPK 在氧化应激和脂质代谢中的关键作用, 该通路可作为治疗肝脏脂质浸润和炎症的潜在治疗靶标。同时, 已有研究表明 AMPK/Nrf2 通路可能是调节非酒精性脂肪肝发展进程的关键通路<sup>[8]</sup>。

龙胆苦苷 (gentiopicroside, GPS) 是由龙胆科植物龙胆草中提取的裂环烯醚萜苷类<sup>[9,10]</sup>, 药理研究表明 GPS 具有抗炎镇痛、抗氧化、清除自由基等临床功效, 其保肝利胆疗效显著<sup>[11]</sup>, 然而其保肝机制尚未明确。许多研究显示 GPS 在抗病原微生物、胃肠道、胰腺、心血管疾病甚至呼吸系统疾病与神经精神疾病等方面也有较大的应用潜力<sup>[12]</sup>。同时, GPS 具有显著抗氧化和保护肝脏的作用, 并能促进胆汁分泌和其他生物活性。有报道表明 GPS 对化学物质和 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的肝损伤小鼠具有保

护作用<sup>[13]</sup>。另外, GPS 可通过 AMPK-PPAR $\alpha$  信号通路改善酒精性脂肪肝病症状, 但是目前关于 NAFLD 模型中 GPS 与 TLR4/NF- $\kappa$ B、AMPK/Nrf2 信号通路之间的关联的研究尚未报道。故本实验通过建立大鼠 NAFLD 模型, 采用二甲双胍作对照, 初步研究 GPS 保护肝脏的作用及对 TLR4/NF- $\kappa$ B、AMPK/Nrf2 信号通路的调控作用, 为 GPS 用于临床治疗 NAFLD 提供依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 动物

雄性 SD 大鼠 66 只, 体质量  $200 \pm 20$  g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。所有大鼠均饲养在温度  $22 \pm 2$  °C、湿度 45% ~ 50%、12 h 光照/暗循环的环境下, 自由获取食物和水, 实验前适应 1 周。

### 1.2 实验药物及试剂

GPS (南京道斯夫生物科技有限公司, 纯度 > 98%, 批号: 181116A); 高脂饲料 (D12492, 江苏协同药业生物工程有限公司); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、甘油三酯 (TG) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (Elabscience 公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (南通市碧云天生物技术研究); NF- $\kappa$ Bp-p65、NF- $\kappa$ Bp65、AMPK、p-AMPK 抗体、Nrf2 抗体 (美国 CST); TLR4 抗体 (英国 Abcam);  $\beta$ -actin 单抗 (天锡傲锐东源生物科技有限公司); 辣根酶标志的二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司); Super ECL Plus 超敏发光液 (北京普利莱基因科技有限公司)。

### 1.3 仪器

H2050R 型台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机厂); Epoch 型全波长酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); AUW220D 型微量电子天平 (日本岛津公司); Olympus BX51 型显微镜 (日本奥林巴斯公

司);THZ-C-1 台式冷冻恒温振荡器(太仓市实验设备厂);垂直电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组及处理

66 只 SD 大鼠随机均分为两组:正常组( $n = 13$ )和高脂组( $n = 53$ )。正常组喂普通饲料,高脂组喂高脂饲料。喂养 8 周后,两组各随机抽取 3 只小鼠进行病理检查,评估 NAFLD 模型是否成功<sup>[14]</sup>。确定模型成功后,高脂组随机均分为模型组、二甲双胍组(200 mg/kg)和 GPS 高、中、低剂量(120、60、30 mg/kg)组,每组 10 只。模型组继续喂高脂饲料,各用药组在喂高脂饲料的同时灌胃相应剂量的药物,正常组和模型组给予等体积蒸馏水灌胃,每天 1 次,共 6 周。14 周末,禁食不禁水 16 h,摘除眼球取血,收集肝脏,肝左叶置于 4% 多聚甲醛中固定,肝右叶-80 °C 保存。

### 2.2 血清指标检测

静置血液样本 2 h 后置于高速冷冻离心机 4 500 rpm,4 °C 离心 15 min,收集血清。严格按照试剂盒说明书步骤测定血清中 ALT、AST、SOD、GSH-Px、MDA、TC、TG、LDL-C、HDL-C 的活性或含量。

### 2.3 胰岛素抵抗情况

葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG),ELISA 法检测血清空腹胰岛素(FINS)含量,胰岛素抵抗指数按稳态胰岛素评价指数(HOMA-IR)计算: $HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$ 。

### 2.4 肝组织指标检测

各取相同位置肝脏组织 100 mg,加入磷酸盐缓冲液研磨制成 10% (W/V)肝组织匀浆,根据 ELISA 试剂盒说明书测定肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平。

### 2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测肝组织中 AMPK、p-AMPK、Nrf2、NF- $\kappa$ Bp-p65、NF- $\kappa$ Bp65、TLR-4 蛋白表达水平

称取各组大鼠肝叶相同部位约 60 mg 置于匀浆器中,加入 RIPA 裂解液于冰上研磨制成匀浆,离心后吸取上清液,严格按照 BCA 法测定蛋白浓度并进行定量,煮沸后使其变性,贮存于-20 °C 冰箱中待用。制备电泳胶(10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶),用移液枪将变性蛋白和 Marker 加入上样孔,进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶恒压 80 V,分离胶恒压 120

V)分离蛋白,于冰浴中 300 mA、70 min 条件下转膜,将蛋白转至 PVDF 膜,再用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,TBST 洗涤 3 次后加入一抗 4 °C 孵育过夜;次日,二抗孵育 2 h,ECL 化学发光法显色,全自动化学发光系统显影,Quantity One 4.6 软件分析蛋白灰度值,并以  $\beta$ -actin 为内参,计算各组 AMPK、p-AMPK、Nrf2、NF- $\kappa$ Bp-p65、NF- $\kappa$ Bp65、TLR-4 蛋白的相对表达量。

### 2.6 肝组织病理学检查

根据油红 O 染色方法,将肝脏冰冻切片,60% 异丙醇浸洗 2 min,油红 O 工作液染色,苏木精复染,甘油明胶封片。封片后光学显微镜下观察并拍摄肝脏脂质沉积情况。

### 2.7 统计学方法

采用 Graph pad 5.0 软件对数据进行统计分析,实验数据均以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,每两组间比较应用  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 GPS 对 NAFLD 大鼠血清中 ALT、AST 的影响

与正常组相比,模型组中的 ALT 和 AST 活性明显增高( $P < 0.01$ )。与模型组相比,二甲双胍组和 GPS 各剂量组中 ALT 和 AST 活性均明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),表明 GPS 对肝脏具有一定的保护作用,结果见表 1。

### 3.2 GPS 对 NAFLD 大鼠血清中 MDA、SOD、GSH-Px 的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 MDA 含量明显升高( $P < 0.01$ ),SOD 和 GSH-Px 活性显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍组和 GPS 各剂量组能一定程度地降低 NAFLD 大鼠血清中 MDA 的含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且提高 SOD、GSH-Px 的活性,差异具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明 GPS 保护肝脏可能与抑制氧化应激有关,结果见表 2。

### 3.3 GPS 对 NAFLD 大鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的影响

与正常组相比,模型组中的 TC、TG、LDL-C 水平明显增高,而 HDL-C 明显降低( $P < 0.01$ ),表明本实验建立的 NAFLD 动物模型成功。与模型组相比,二甲双胍组和 GPS 各剂量组均能不同程度地降低 NAFLD 大鼠的 TC、TG 和 LDL-C 水平,且提高 HDL-C 水平( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明 GPS 能改

善 NAFLD 大鼠的脂质代谢从而保护肝脏。结果见表 3。

表 1 GPS 对 NAFLD 大鼠血清中 ALT、AST 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect on the serum ALT and AST of GPS( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	给药剂量 Dose(mg/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组 Normal	-	38.76 $\pm$ 3.69	104.56 $\pm$ 9.67
模型组 Model	-	197.54 $\pm$ 17.84 <sup>##</sup>	186.56 $\pm$ 16.74 <sup>##</sup>
二甲双胍组 Metformin	200	61.50 $\pm$ 6.71 <sup>**</sup>	127.94 $\pm$ 11.86 <sup>**</sup>
GPS 低剂量组 Gentiopicroside-L	30	181.81 $\pm$ 15.41 <sup>*</sup>	169.84 $\pm$ 15.73 <sup>*</sup>
GPS 中剂量组 Gentiopicroside-M	60	135.93 $\pm$ 13.81 <sup>**</sup>	148.83 $\pm$ 15.83 <sup>**</sup>
GPS 高剂量组 Gentiopicroside-H	120	78.50 $\pm$ 6.91 <sup>**</sup>	125.54 $\pm$ 11.87 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;下同。

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;The same below.

表 2 GPS 对 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of GPS on the serum SOD,GSH-Px and MDA( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	SOD (U/mgprot)	GSH-Px (U/mgprot)	MDA (U/mgprot)
正常组 Normal	-	175.67 $\pm$ 15.74	169.74 $\pm$ 17.63	5.93 $\pm$ 0.61
模型组 Model	-	95.27 $\pm$ 8.75 <sup>##</sup>	64.85 $\pm$ 7.43 <sup>##</sup>	11.86 $\pm$ 1.63 <sup>##</sup>
二甲双胍组 Metformin	200	159.72 $\pm$ 14.52 <sup>**</sup>	139.76 $\pm$ 12.87 <sup>**</sup>	7.24 $\pm$ 0.84 <sup>**</sup>
GPS 低剂量组 Gentiopicroside-L	30	112.73 $\pm$ 10.63 <sup>*</sup>	85.79 $\pm$ 9.21 <sup>**</sup>	10.15 $\pm$ 1.82 <sup>*</sup>
GPS 中剂量组 Gentiopicroside-M	60	129.84 $\pm$ 11.34 <sup>**</sup>	99.86 $\pm$ 10.16 <sup>**</sup>	8.76 $\pm$ 0.91 <sup>**</sup>
GPS 高剂量组 Gentiopicroside-H	120	139.87 $\pm$ 12.94 <sup>**</sup>	111.63 $\pm$ 12.82 <sup>**</sup>	7.87 $\pm$ 0.83 <sup>**</sup>

表 3 GPS 对血清中 TC、LDL-C、HDL-C、TG 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of GPS on the serum TC,LDL-C,HDL-C and TG( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
正常组 Normal	-	0.75 $\pm$ 0.06	1.69 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.075	1.79 $\pm$ 0.16
模型组 Model	-	3.98 $\pm$ 0.45 <sup>##</sup>	5.98 $\pm$ 0.61 <sup>##</sup>	1.69 $\pm$ 0.21 <sup>##</sup>	0.62 $\pm$ 0.081 <sup>##</sup>
二甲双胍组 Metformin	200	1.05 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup>	2.98 $\pm$ 0.31 <sup>**</sup>	0.98 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	1.54 $\pm$ 0.19 <sup>**</sup>
GPS 低剂量组 Gentiopicroside-L	30	3.57 $\pm$ 0.41 <sup>*</sup>	4.59 $\pm$ 0.51 <sup>**</sup>	1.45 $\pm$ 0.16 <sup>*</sup>	0.89 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>
GPS 中剂量组 Gentiopicroside-M	60	2.96 $\pm$ 0.35 <sup>**</sup>	3.89 $\pm$ 0.41 <sup>**</sup>	1.21 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>	1.17 $\pm$ 0.13 <sup>**</sup>
GPS 高剂量组 Gentiopicroside-H	120	1.89 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>	3.06 $\pm$ 0.41 <sup>**</sup>	1.16 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>	1.31 $\pm$ 0.16 <sup>**</sup>

### 3.4 GPS 对 NAFLD 大鼠胰岛素抵抗水平的影响

与正常组相比,模型组中的 FINS、FBG、HOMA-IR 水平明显增高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍组和 GPS 高、中剂量组 FBG、FINS、HOMA-IR 水平显著降低( $P < 0.01$ ),GPS 低剂量组 FBG 水平显著降低( $P < 0.01$ ),FINS、HOMA-IR 水平无统计学差异( $P > 0.05$ ),表明 GPS 能改善 NAFLD 大鼠的胰岛素抵抗水平。结果见表 4。

### 3.5 GPS 对 NAFLD 大鼠肝脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍和 GPS 各剂量组都能有效抑制 NAFLD 大鼠肝脏 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平的升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),表明 GPS 能抑制炎症反应从而保护肝脏。结果见表 5。

表4 GPS对胰岛素抵抗的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 4 The of GPS effects on insulin resistance( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	FBG (mmol/L)	FINS (ng/mL)	HOMA-IR
正常组 Normal	-	4.51 ± 0.21	2.78 ± 0.13	0.55 ± 0.06
模型组 Model	-	5.71 ± 0.12 <sup>##</sup>	4.17 ± 0.21 <sup>##</sup>	1.06 ± 0.15 <sup>##</sup>
二甲双胍组 Metformin	200	4.84 ± 0.15 <sup>**</sup>	2.98 ± 0.16 <sup>**</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>**</sup>
GPS 低剂量组 Gentiopicroside-L	30	5.41 ± 0.17 <sup>**</sup>	4.08 ± 0.18	0.98 ± 0.11
GPS 中剂量组 Gentiopicroside-M	60	5.24 ± 0.19 <sup>**</sup>	3.86 ± 0.21 <sup>**</sup>	0.89 ± 0.09 <sup>**</sup>
GPS 高剂量组 Gentiopicroside-H	120	5.09 ± 0.21 <sup>**</sup>	3.31 ± 0.15 <sup>**</sup>	0.75 ± 0.08 <sup>**</sup>

表5 GPS对肝组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 5 Effect of GPS on the hepatic TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (pg/mg)	IL-1 $\beta$ (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
正常组 Normal	-	114.43 ± 10.64	127.3 ± 14.91	87.54 ± 9.71
模型组 Model	-	387.31 ± 43.51 <sup>##</sup>	381.93 ± 42.03 <sup>##</sup>	254.91 ± 21.65 <sup>##</sup>
二甲双胍组 Metformin	200	227.74 ± 21.65 <sup>**</sup>	197.3 ± 23.07 <sup>**</sup>	135.72 ± 12.13 <sup>**</sup>
GPS 低剂量组 Gentiopicroside-L	30	334.61 ± 16.71 <sup>**</sup>	341.88 ± 29.99 <sup>**</sup>	208.62 ± 23.85 <sup>*</sup>
GPS 中剂量组 Gentiopicroside-M	60	295.61 ± 31.65 <sup>**</sup>	276.14 ± 28.17 <sup>**</sup>	186.43 ± 19.62 <sup>**</sup>
GPS 高剂量组 Gentiopicroside-H	120	249.69 ± 27.83 <sup>**</sup>	234.3 ± 26.81 <sup>**</sup>	162.71 ± 17.11 <sup>**</sup>

### 3.6 GPS对NAFLD大鼠肝脏中TLR-4/NF- $\kappa$ B及AMPK/Nrf2通路蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中NF- $\kappa$ Bp-p65、TLR-4水平显著升高而AMPK、Nrf2水平明显降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二甲双胍和GPS

各剂量组都能有效抑制NAFLD大鼠肝脏NF- $\kappa$ Bp-p65与TLR-4水平的升高,同时上调AMPK和Nrf2的表达水平( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),表明GPS能通过调控TLR-4/NF- $\kappa$ B及AMPK/Nrf2通路从而保护肝脏,结果见图1。

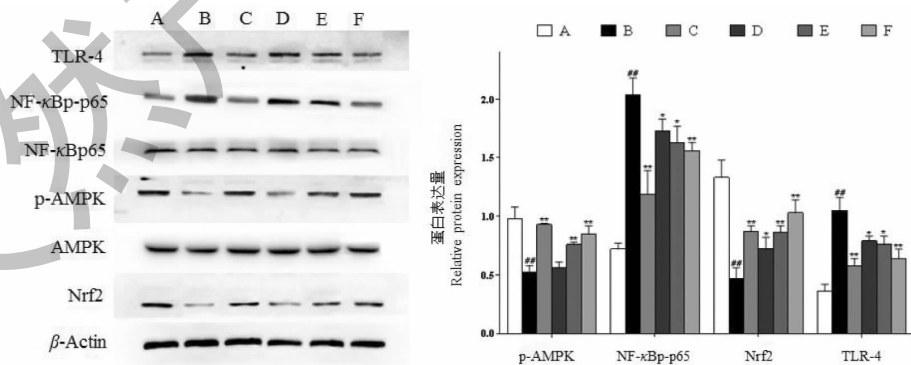


图1 GPS对TLR-4/NF- $\kappa$ B及AMPK/Nrf2的影响

Fig. 1 Effect of GPS on TLR-4/NF- $\kappa$ B and AMPK/Nrf2

注:A:正常组;B:模型组;C:二甲双胍组;D:GPS低剂量组;E:GPS中剂量组;F:GPS高剂量组;下同。Note:A:Normal group;B:Model group;C:Metformin group;D:GPS-low dose group;E:GPS-medium dose group;F:GPS-high dose group;The same below.

### 3.7 GPS对大鼠肝组织病理形态的影响

油红O染色结果显示,正常组(图2A)大鼠无

明显脂滴和炎性浸润,模型组(图2B)大鼠肝脏出现大面积的红色脂肪滴,有明显炎性细胞浸润。二甲

双胍组(图 2C)和 GPS 各剂量组(图 2D-F)肝脏红

色脂滴明显减少,炎性细胞数量明显减少。

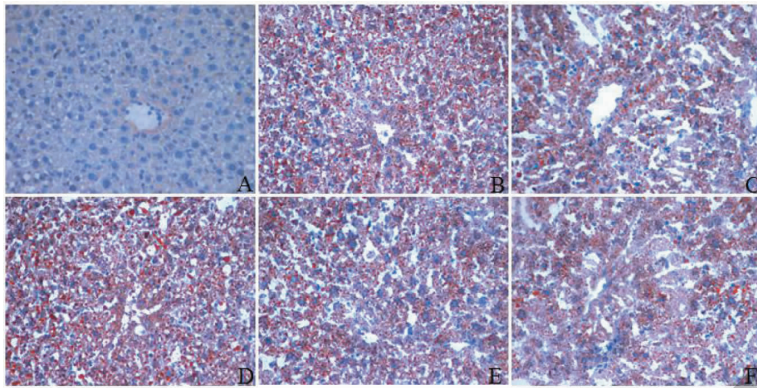


图 2 肝组织油红 O 染色(200 ×)

Fig. 2 Liver tissue oil red O staining (200 ×)

#### 4 讨论

近年来 NAFLD 的发病率呈明显的上升趋势,已成为慢性肝病及肝功能异常的主要病因之一<sup>[15]</sup>。目前用于治疗 NAFLD 的相关药物多数需要通过肝脏代谢,在治疗 NAFLD 的同时也加重了肝脏的负担,而且药物对 NAFLD 治疗效果有限,尚未发现特异性较强的药物<sup>[16]</sup>,因此,寻找到疗效确切且副作用小的药物来治疗 NAFLD 有较大的现实意义。

高脂饮食能引起血清中游离脂肪酸(FFA)增加,FFA 在体内不断积累引起肝损伤,细胞膜通透性增高,导致细胞中 ALT、AST 溢出进入血液<sup>[17]</sup>。模型组血清中 ALT、AST 的活性升高,伴随着 TC、TG、LDL-C 含量上升,HDL-C 含量下降,表明本实验成功建立 NAFLD 模型。研究结果显示,GPS 有效改善 NAFLD,并对转氨酶和血脂有调节作用,对肝脏起保护作用。

NAFLD 的具体发病机制尚不清楚,目前“多重平行打击”发病机理已被广泛接受。炎症、氧化应激和胰岛素抵抗等多种因素共同导致了 NAFLD 的发生与进展<sup>[18,19]</sup>。IR 为中心引起的肝脏脂肪浸润产生大量 FFA,机体氧化途径无法处理过量 FFA 则会导致 TG 增多,进而引起脂肪堆积诱发脂肪变性<sup>[20]</sup>。同时 FFA 增多刺激肝脏枯否细胞分泌炎症反应调节因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6,促进炎症的发生,导致肝细胞炎症浸润、坏死及纤维化的发生<sup>[21]</sup>。肝脏发生炎症反应时,TLR-4 与其配体结合激活 NF- $\kappa$ B,从而引起一系列的炎性因子的合成和释放,诱发机体产生炎症反应<sup>[22]</sup>。本实验结果表明,GPS 高、中、低剂量组均能降低胰岛素抵抗指数、TG、TC、LDL-C 及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平,提高

HDL-C 水平,能够有效抑制 TLR-4 及 NF- $\kappa$ B 信号通路,其中 GPS 高剂量组改善情况最明显,提示 GPS 可能通过抑制炎症反应、调节脂质代谢,调控 TLR-4/NF- $\kappa$ B 通路保护肝脏。

氧化应激是非酒精性脂肪肝病公认的损伤因素之一,肝细胞内富含线粒体有利于氧化 FFA,为细胞提供能量的同时还会产生大量活性氧自由基<sup>[23]</sup>。机体的抗氧化防御系统可以通过抑制自由基产生、清除自由基、修复损伤及诱导抗氧化酶发挥保护作用,SOD 和 GSH-Px 为重要的抗氧化酶,能够有效清除自由基,抑制脂质过氧化反应物形成,起到保护机体的作用<sup>[24]</sup>。MDA 为自由基参与脂质过氧化反应的终产物,其异常表达可严重破坏细胞膜的结构,引起细胞肿胀、坏死<sup>[25]</sup>。AMPK 的激活可促进下游分子 Nrf2 的细胞核转位,上调 Nrf2 的表达<sup>[26]</sup>。Nrf2 通过调节因子发挥抗炎、抗氧化作用,介导下游多种抗氧化蛋白和酶如 HO-1 减轻肝脏氧化应激<sup>[27]</sup>。本研究结果表明,与模型组比较,GPS 各剂量组可明显增强 SOD、GSH-Px 活性并降低 MDA 含量,同时显著增强 p-AMPK、Nrf2 蛋白表达水平,提示 GPS 可能激活 AMPK/Nrf2 信号通路,进而抑制氧化应激从而达到保肝作用。

综上所述,GPS 可有效改善 NAFLD 大鼠损伤状况,调节胰岛素抵抗情况,抑制氧化应激水平和炎症反应,调控 TLR-4/NF- $\kappa$ B 和 AMPK/Nrf2 信号通路,为临床应用提供新策略。

#### 参考文献

- 1 Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know[J]. World J Gastro-

- enterol, 2014, 20: 12956-12980.
- 2 Yu LY, Quan YY, Gong LH, et al. Therapeutic effect of ethanol extract of processed *Polygonum multiflorum* and its main component emodin on zebrafish nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 766-771.
  - 3 Zhang KF, Gao Y, Cao HK, et al. The effects of *Dicliptera chinensis* polysaccharide on glucose and lipid metabolism in rats with high fat diet based on AMPK/SREBP-1 pathway[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1777-1782.
  - 4 Fang YL, Chen H, Wang CL, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: from "two hit theory" to "multiple hit model"[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24: 2974-2983.
  - 5 Lin R, Wu D, Wu FJ, et al. Non-alcoholic fatty liver disease induced by perinatal exposure to bisphenol a is associated with activated mTOR and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways in offspring rats[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2019, 10: 620.
  - 6 Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48: 357-371.
  - 7 Li XN, Song J, Zhang L, et al. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin[J]. Diabetes, 2009, 58: 2246-2257.
  - 8 Zhao Z, Wang C, Zhang L, et al. Lactobacillus plantarum NA136 improves the non-alcoholic fatty liver disease by modulating the AMPK/Nrf2 pathway[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103: 5843-5850.
  - 9 Xia PF, Ma X, Wu GT, et al. Preparation and evaluation of quality and security of gentiopicroside nano emulsion[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1824-1830.
  - 10 Zhu HT, Zheng CW, Zhao P, et al. Content analysis of gentiopicroside in wild and tissue culture seedlings of *Gentiana rigescens*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23: 482-485.
  - 11 Chen L, Wang HB, Sun XL, et al. Study on the analgesic and anti-inflammatory activities of gentiopicroside[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2008, 20: 903-906.
  - 12 Niu YT, Zhao YP, Jiao YF, et al. Protective effect of gentiopicroside against dextran sodium sulfate induced colitis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39(10): 16-22.
  - 13 Lian LH, Wu YL, Wan Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. Chem Biol Interact, 2010, 188(1): 127-133.
  - 14 Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22: 10180-10188.
  - 15 Ricci G, Pirillo I, Tomassoni D, et al. Metabolic syndrome, hypertension, and nervous system injury: epidemiological correlates[J]. Clin Exp Hypertens, 2017, 39(1): 8-16.
  - 16 Godos J, Federico A, Dallio M, et al. Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms of protection[J]. Int J Food Sci Nutr, 2017, 68(1): 18-27.
  - 17 Ma Z, Chu L, Liu H, et al. Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44819.
  - 18 Borrelli A, Bonelli P, Tuccillo FM, et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: current and innovative therapeutic approaches[J]. Redox Biol, 2018, 15: 467-479.
  - 19 Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis[J]. Hepatology, 2010, 52: 1836-1846.
  - 20 Qureshi K, Abrams G A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 3540-3553.
  - 21 Su LQ, Wang YD, Chi HY. Effect of curcumin on glucose and lipid metabolism, FFAs and TNF- $\alpha$  in serum of type 2 diabetes mellitus rat models[J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24: 1776-1780.
  - 22 Li YW, Zhang Y, Zhang L, et al. Protective effect of tea polyphenols on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of TLR4/NF- $\kappa$ Bp65 signal pathway[J]. Gene, 2014, 542(1): 46-51.
  - 23 Han E, Lee Y. Non-alcoholic fatty liver disease: the emerging burden in cardiometabolic and renal diseases[J]. Diabetes Metab J, 2017, 41: 430-437.
  - 24 Qu LL, Yu B, Li Z, et al. Gastrodin ameliorates oxidative stress and proinflammatory response in nonalcoholic fatty liver disease through the AMPK/Nrf2 pathway[J]. Phytother Res, 2016, 30: 402-411.
  - 25 Guo Y, Liang X, Meng M, et al. Hepatoprotective effects of Yulansan flavone against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatic fibrosis in rats[J]. Phytomedicine, 2017, 33(17): 28-35.
  - 26 Zheng L, Yin L, Xu L, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway *in vivo*[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 481-488.
  - 27 Xiao KM, Sun CF, Yao SK. Protective effect of gentiopicrosin on oxidative stress damage in HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2019, 14: 1530-1534.